

Use of a saponins or sapogenols to increase the amount of collagen IV at the dermal-epidermal junction

Patent Number : **WO9962480**

International patents classification : A61K-006/00 A61K-007/48 A01N-025/00 A01N-065/00 A61K-007/00 A61K-007/42 A61K-035/78

• Abstract :

WO9962480 A NOVELTY - The use of a triterpene saponin or sapogenol as cosmetic or pharmaceutical agent to increase the amount of collagen IV at the dermal-epidermal junction.

DETAILED DESCRIPTION - The triterpene saponin or sapogenol is preferably extracted from a plant source, especially from Glycine max, Phaseolus vulgaris, Phaseolus aureus, Phaseolus lunatus, Vicia faba, Lens culinaris, Cicer arietum, Vigna angularis, Vigna mungo, Oxytropis ochrocephala, Oxytropis glabra, Pisum sativa, Sophora favesces, Asparalus membranaceus, Crotalaria albida, Arachis hypogea, Galega officinalis, Wistaria brachybotrys, Trifolium repens, Medicago alfalfa or Medicago sativa.

ACTIVITY - Normal human keratinocytes were cultured for 72 hours in a medium in the presence or absence of a commercial soya extract comprising 29 - 30% soyasaponins, a major part of which were group B soyasapogenols. The amount of collagen IV was measured by an ELISA method and showed that the percentage of collagen IV increased by 19, 27, and 37.5% in the presence of 5, 10, and 25 g/ml of soya saponins respectively.

USE - Cosmetic and pharmaceutical treatment of collagen IV deficiency at the dermal-epidermal junction, such as treatment of wrinkles. (Dwg.0/0)

• Publication data :

Patent Family : WO9962480 A2 19991209 DW2000-10 A61K-007/48 Fre 23p * AP: 1999WO-FR01260 19990528 DSNW: JP US DSRW: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR-IE-IT-LU-MC-NL PT SE

FR2779058 A1 19991203 DW2000-10 A61K-007/48 AP: 1998FR-0006821 19980529 EP1079797 A2 20010307 DW2001-14 A61K-007/48 Fre FD: Based on WO9962480 AP: 1999EP-0923642 19990528; 1999WO-FR01260 19990528 DSR: DE ES FR GB IT JP2002516837 W 20020611 DW2002-53 A61K-007/48 36p FD: Based on WO9962480 AP: 1999WO-FR01260 19990528; 2000JP-0551737 19990528

US6641848 B1 20031104 DW2003-74 A61K-006/00 FD: Based on WO9962480 AP: 1999WO-FR01260 19990528; 2000US-0700654 20001117 Priority n° : 1998FR-0006821 19980529 Covered countries : 20 Publications count : 5

• Patentee & Inventor(s) :

Patent assignee : (DIOR) PARFUMS DIOR SA CHRISTIAN Inventor(s) : BONTE F; DUMAS M; PERRIER P

• Accession codes :

Accession N° : 2000-116349 [10] Sec. Acc. n° CPI : C2000-035493

• Derwent codes :

Manual code : CPI: B01-B03 B03-L B04-A06 B04-A07E B04-A08 B04-A09 B04-A10 B04-M01 B04-N02 B06-D02 B07-D03 B07-D12 B09-B B10-B01B B10-B02H B10-C02 B10-E04C B14-N17 B14-R01 D08-B09A Derwent Classes : B04 B05 D21 Compound Numbers : R04592-K R04592-M R10186-K R10186-M R01096-K R01096-M R10482-K R10482-M R01059-K R01059-M R01372-K R01372-M R01409-K R01409-M R15414-K R15414-M R01655-K R01655-M R11509-K R11509-M RA0W12-K RA0W12-M R00282-K R00282-M R00113-K R00113-M R01250-K R01250-M R00145-K R00145-M

• Update codes :

Basic update code :2000-10 Equiv. update code :2000-10; 2001-14; 2002-53; 2003-74

Others :

Technology Abstract

TECHNOLOGY FOCUS

ORGANIC CHEMISTRY - The triterpene saponin or sapogenols are extracted and isolated as described in WO 92/09262

PHARMACEUTICALS - Preferred

Compositions: The compositions for pharmaceutical and cosmetic preferably contain 0.001 - 5%, and especially 0.01 - 2 wt% of the triterpene saponin or sapogenol.

They may further contain other known active materials such as madecassic acid and asiatic

THIS PAGE BLANK (USPTO)

acid and their osides, alpha-1-proteinase inhibitors, collagenase inhibitors, elastase inhibitors, lysine, proline, imidazoles, xanthines, tyrosine and its derivatives, histamine and its derivatives, rubifacients, trace elements, progesterone, cyproterone acetate, minoxidil, azelaic acid, and *Serenoa repens* extract.

Keyword Index Terms [1] 6478-1-0-0-CL; 101053-0-0-0-CL; 465-1-0-0-CL; 65456-0-0-0-CL; 129495-0-0-0-CL; 166768-1-0-0-CL; 2634-0-0-0-CL; 8187-0-0-0-CL; 87845-1-0-0-CL; 105509-0-0-0-CL; 490-0-0-0-CL

UE4 2001-03; 2002-08; 2003-11

THIS PAGE BLANK (USPTO)

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 779 058

②① N° d'enregistrement national :

98 06821

⑤① Int Cl⁶ : A 61 K 7/48, A 61 K 7/42

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 29.05.98.

③① Priorité :

⑦① Demandeur(s) : *PARFUMS CHRISTIAN DIOR Société
anonyme — FR.*

⑦② Inventeur(s) : BONTE FREDERIC, DUMAS MARC et
PERRIER PIERRE.

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 03.12.99 Bulletin 99/48.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

⑤④ UTILISATION D'AU MOINS UNE SAPONINE OU UN SAPOGENOL COSMETIQUEMENT ACCEPTABLE,
COMME AGENT COSMETIQUE DESTINE A AUGMENTER LA QUANTITE DE COLLAGENE IV DANS LA
JONCTION DERMO-EPIDERMIQUE.

⑤⑦ La présente invention concerne généralement l'utilisa-
tion de saponines ou sapogénols en particulier extraits de
plante, de préférence de soja ou de Medicago, en cosméto-
logie ainsi que pour la fabrication de compositions pharma-
ceutiques destinées au traitement de la peau en vue
d'augmenter la quantité de collagène IV dans la jonction
dermo-épidermique.

Elle concerne également de nouvelles compositions
cosmétiques ou pharmaceutiques favorisant l'augmentation
de la quantité de collagène IV dans la jonction dermo-épi-
dermique ainsi qu'un procédé de traitement cosmétique uti-
lisant une saponine ou un sapogénol.

Application: traitement anti-rides et traitement des mala-
dies liées à une déficience de la jonction dermo-épidermi-
que résultant d'une quantité insuffisante de collagène IV.

FR 2 779 058 - A1



La présente invention concerne généralement l'utilisation de saponines ou sapogénols en cosmétologie ainsi que pour la fabrication de compositions pharmaceutiques destinées au traitement de la peau en vue d'augmenter la quantité de collagène IV dans la jonction dermo-épidermique.

Elle concerne également de nouvelles compositions cosmétiques ou pharmaceutiques favorisant l'augmentation de la quantité de collagène IV dans la jonction dermo-épidermique ainsi qu'un procédé de traitement cosmétique utilisant une saponine ou un sapogénol.

On sait que la jonction dermo-épidermique est une structure complexe qui assure la cohésion et les échanges entre le derme et l'épiderme, indispensables au bon fonctionnement de la peau.

On sait, par ailleurs, que le collagène de type IV, encore dénommé collagène IV est un constituant majeur de la jonction dermo-épidermique qui intervient notamment dans le maintien d'une interface fonctionnelle entre le derme et l'épiderme.

L'état physiologique optimum de la jonction dermo-épidermique dépend d'une quantité suffisante de collagène IV présente dans cette jonction dermo-épidermique.

Il est donc souhaitable, en vue de maintenir ou de restaurer l'état physiologique de la jonction dermo-épidermique, de disposer d'un moyen permettant d'y augmenter la quantité de collagène IV.

Il a été découvert, et ceci constitue le fondement de la présente invention, que les saponines ainsi que les sapogénols cosmétiquement acceptables sont particulièrement appropriés en tant qu'agents permettant d'augmenter la quantité de collagène IV dans la jonction dermo-épidermique.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente demande vise à couvrir l'utilisation d'au moins une saponine ou un sapogénol cosmétiquement acceptables, en particulier une saponine ou un sapogénol extrait de plante, de préférence de soja ou d'une plante de type Medicago, ou d'un extrait végétal riche en de tels composés, comme agent cosmétique destiné à augmenter la quantité de collagène IV dans la jonction dermo-épidermique.

Outre le domaine cosmétique, l'invention trouve également application dans le domaine pharmaceutique, notamment dermatologique.

Ainsi, selon un second aspect, la présente demande vise à couvrir l'utilisation d'au moins une saponine ou un sapogénol pharmaceutiquement acceptables, en particulier une saponine ou un sapogénol extrait de plante, de préférence de soja ou d'une plante de type *Medicago*, ou d'un extrait végétal riche en de tels composés, pour la fabrication d'une composition pharmaceutique, notamment dermatologique destinée à traiter les pathologies liées à une déficience de la jonction dermo-épidermique résultant d'une quantité insuffisante de collagène IV.

De très nombreuses saponines et de très nombreux sapogénols s'avèrent appropriés dans le cadre de l'utilisation conforme à la présente invention, dans le domaine cosmétique ou pharmaceutique.

Avantageusement, ces composés, qui devront être cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables, seront extraits de plantes.

En particulier, on pourra utiliser des saponines extraites de plantes, de préférence extraites de *Glycine max* (soja), de *Phaseolus vulgaris*, de *Phaseolus aureus*, de *Phaseolus lunatus*, de *Vicia faba*, de *Lens culinaris*, de *Cicer arietum*, de *Vigna angularis*, de *Vigna mungo*, de *Oxytropis ochrocephala*, d'*Oxytropis glabra*, de *Pisum sativum*, de *Sophora favesces*, d'*Asparalus membranaceus*, de *Crotalaria albida*, d'*Arachis hypogea*, de *Galega officinalis*, de *Wistaria brachybotrys*, de *Trifolium repens*, ou extraites de plantes du type *Medicago*, en particulier *Medicago alfalfa* et *Medicago sativa* désigné souvent par le nom de "luzerne".

Alternativement, on pourra utiliser des extraits végétaux riches en saponines ou sapogénols.

Le soja et les plantes de type *Medicago* sont des plantes particulièrement appropriés pour fournir des saponines ou sapogénols utilisables dans le cadre de l'invention.

Avantageusement, ces saponines ou sapogénols seront de nature triterpénique, en particulier des soyasaponines ou soyasapogénols de type A ou de type B, et extraits en particulier d'une plante de type *Medicago* tel que *Medicago sativa*.

Les saponines ou sapogénols précités peuvent être extraits à partir de toute partie de la plante mais seront de préférence extraits à partir des racines dans le cas de *Medicago* et des graines dans le cas du soja.

Les conditions d'extraction sont bien connues de l'homme du l'art qui pourra, par exemple, se reporter au document WO 92/09262 incorporé ici par référence.

5 Dans le cadre de l'utilisation conforme à la présente invention, la proportion en saponine(s) ou en sapogénol (s) ou en extrait végétal en contenant est avantageusement comprise entre 0,001 % et 5 %, mieux entre 0,01 et 2 %, en poids, par rapport au poids total de la composition cosmétique ou pharmaceutique finale.

10 Il a également été découvert, de façon tout à fait inattendue que l'effet bénéfique des saponines et des sapogénols peut être sensiblement augmenté lorsque ces composés sont utilisés en association avec un ecdystéroïde ou un dérivé acétylé d'ecdystéroïde comme, en particulier, la β -ecdysone ou ecdystérone.

Les ecdystéroïdes, et en particulier l'ecdystérone sont des substances naturelles bien connues, présentes notamment chez les insectes et dans certaines
15 plantes telles que Polypodium vulgare et Cyanotis arachnoidea.

Dans le cadre d'une utilisation associant une saponine ou un sapogénol et un ecdystéroïde, ces composés seront utilisés de préférence dans un rapport pondéral compris entre 1:10 et 10:1 et de préférence encore égal à 1:1.

20 Les saponines ou sapogénols peuvent en outre être utilisées en association avec une autre substance active par exemple choisie parmi le groupe constitué par l'acide madécassique, l'acide asiatique, le madécassoside, l'asiaticoside, l' α -1-protéinase inhibiteur, les inhibiteurs de collagénase tels que l'acide rétinolique, les inhibiteurs d'élastase, la lysine, la proline, le 2-oxoglutarate, le ginsénoside R₀, la vitamine D et ses dérivés, les vitamines, en particulier la
25 vitamine A, B ou E ; les xanthines, la tyrosine ou ses dérivés comme par exemple le tyrosinate de glucose, la malylytyrosine, la quinine ou ses dérivés, les rubéfiants tels que le nicotinate de méthyle, des hydrolysats de kératine, des oligoéléments tels que le zinc, le sélénium, cuivre, des inhibiteurs de 5- α -réducteurs tels que progestérone, l'acétate de cyprotérone, le minoxidil, l'acide azélaïque et ses
30 dérivés, le 1,4-méthyl-4-azastéroïde, en particulier la 17- β -N,N-diéthylcarbamoyle-4-méthyl-4-aza-5- α -androstan-3-one, ou encore un extrait de *Serenoa repens*.

Dans ce cas, la concentration en cette (ou ces) autre(s) substance(s) active(s) est comprise entre 0,0001 % et 5 % en poids par rapport au poids de la composition finale.

Ces substances, incluant les saponines ou sapogénols, peuvent éventuellement être incorporées au moins en partie dans des phases lamellaires lipidiques hydratées ou dans des vésicules de type liposomes.

5 Selon un troisième aspect, la présente demande vise à couvrir de nouvelles compositions cosmétiques ou pharmaceutiques favorisant l'augmentation de la quantité de collagène IV dans la jonction dermo-épidermique.

Ces compositions sont essentiellement caractérisées par le fait qu'elles contiennent une quantité efficace de l'association d'au moins une saponine ou un sapogénol tel que défini précédemment dans le cadre de la description de
10 l'utilisation conforme à l'invention, avec au moins un ecdystéroïde, en particulier la β -ecdysone ou ecdystérone.

Dans ce cas, la saponine ou le sapogénol précité et l'ecdystéroïde précité sont associés dans un rapport pondéral compris entre 1 : 10 et 10 : 1, et de préférence égal à 1 : 1.

15 Selon un quatrième aspect, la présente demande vise à couvrir un procédé de traitement cosmétique dans lequel on procède à l'administration topique à une personne en ayant besoin, d'une quantité efficace d'au moins une saponine ou d'au moins un sapogénol tel que défini précédemment éventuellement en association avec une ou plusieurs autres substances actives telles que
20 mentionnées ci-dessus et/ou en association avec un ecdystéroïde, en particulier l'ecdystérone.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lecture de la description explicative qui va suivre faite en référence à plusieurs exemples donnés à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en
25 aucune façon limiter la portée de l'invention.

Dans les exemples, les pourcentages sont exprimés en poids, la température est la température ambiante, et la pression est la pression atmosphérique, sauf indication contraire. Dans le cas des extraits, les quantités de ceux-ci sont exprimées en poids sec.

30

Exemple 1

Mise en évidence de l'augmentation de la quantité de collagène IV avec des saponines extraites de graines de soja

Dans cet exemple, on utilise un extrait de graines de soja, disponible
35 dans le commerce sous la référence SOY SELECT LOT 26040/2 auprès de la société italienne Indena.

Cet extrait contient selon les informations commerciales des saponines de la catégorie des "soyasaponines" en proportion de 29 à 30 % en poids sec, comprenant majoritairement des soyasapogénols du groupe B.

Afin de valider la pertinence du protocole expérimental choisi, une série de ces essais ont été réalisés avec un témoin positif, le Transforming Growth Factor - beta (TGF-beta), connu comme augmentant la quantité de collagène IV dans une culture de kératinocytes humains. On pourra se reporter à l'article de Köning A., Bruckner-Tuderman L. ; J. Cell. Biol. ; 1992 May ; 117 (3) ; 679-85.

10 1. Protocole du test

a. Provenance des kératinocytes :

Les cultures de kératinocytes humains normaux (KHN) sont établies à partir d'un prélèvement chirurgical de peau saine. Dans la présente étude, les tests ont été réalisés sur une souche cellulaire provenant d'un lifting d'une femme caucasienne de 44 ans, souche notée KH 44.

b. Conditions de culture :

Les kératinocytes sont cultivés dans le milieu de croissance K-SFM, qui est un milieu spécifique de culture des kératinocytes, SFM (Serum Free Medium) complet, complémenté en EGF (Epidermal Growth Factor) et en extrait pituitaire, commercialisé par la société Gibco, France. Les cellules ont été sous-cultivées une fois à partir de la primoculture selon un passage, noté P1.

c. Conditions de traitement :

L'ensemencement des cellules est réalisé en plaques de culture à 96 puits à raison de 25 000 KHN par puits dans le milieu K-SFM. Après 24 h d'incubation nécessaire à la bonne adhérence des cellules, le milieu d'ensemencement est retiré et remplacé par du milieu K-SFM dilué au 50^e dans le même milieu de base, mais dépourvu de EGF et d'extrait pituitaire.

On ajoute alors le produit à tester selon l'invention que l'on dissout dans le DMSO à diverses concentrations reportées au tableau I ci-après, et que l'on cultive pendant 72 h.

Les témoins recevront la même quantité de solvant DMSO que pour le produit testé à 0,1 % final.

Les surnageants de culture sont récupérés pour réaliser un dosage ELISA comme expliqué ci-après.

d. Dosage ELISA du collagène IV :

Le protocole du dosage du collagène IV par une méthode ELISA est adapté de celui décrit par DUMAS M. et al. dans Mechanisms of Ageing and Development, 1994, 73, pages 179-187.

5 On utilise un anticorps anti-collagène IV humain fourni par l'Institut Pasteur, Lyon, France. Une courbe d'étalonnage est effectuée avec du collagène IV de placenta humain de chez Sigma. Parallèlement, un dosage global des protéines est effectué par la technique à l'acide bicinchoninique, kit BCA, commercialisé par la société Sigma, France, dans le but de rapporter la quantité de collagène IV au
10 taux de protéines cellulaires.

Six cultures sont réalisées pour chacune des trois concentrations et pour l'essai témoin.

e. Expression des résultats et interprétation statistique

15 Les résultats de l'augmentation de la quantité de collagène IV dans une culture de kératinocytes sont exprimés en nanogrammes de collagène IV pour 100 µg de protéines après culture pendant 72h.

L'activité A du produit est exprimée en pourcentage et correspond à la formule suivante :

20
$$A = \left(\frac{Q_s - Q_t}{Q_t} \right) \times 100$$

où :

- Qs est la quantité de collagène IV des KHN traités exprimée en ng pour 100 µg de protéines, après 72 heures.
- Qt est la quantité de collagène IV des KHN témoins DMSO exprimée en ng
25 pour 100 µg de protéines, après 72 heures.

Les résultats obtenus sur les cultures traitées (n=6) et témoins (n=6) sont comparés par le test t de Student non apparié, le seuil de significativité étant p = 0,05.

30

2. Résultats-conclusion

Les résultats sont reportés au tableau I ci-après, à partir de la moyenne des mesures sur les différentes cultures :

35

TABLEAU I

PRODUIT	Q (ng de coll IV/100 µg de protéines ; à 72 h)	A (%)	Significativité p = 0,05
témoin DMSO	3,743±0,443	0	
témoin positif (TGF-beta) 10 ng/ml	5,615±0,595	+50	S
saponines de soja 2,5 µg/ml	3,931±0,426	+5	NS
saponines de soja 5 µg/ml	4,474±0,511	+19	S
saponines de soja 10 µg/ml	4,762±0,591	+27	S
saponines de soja 25 µg/ml	5,152±0,596	+37,5	S

S= significatif

5 NS = non significatif

On notera que le taux de collagène IV est exprimé en nanogrammes pour 100 µg de protéines après 72 h de contact avec les cellules.

10 Il apparaît clairement que les saponines testées augmente significativement la quantité de collagène IV dans une culture de kératinocytes humains.

On notera également que le témoin positif (TGF-beta) répond significativement au protocole expérimental choisi, ce qui confirme sa validation et la pertinence des essais réalisés.

15 Ainsi, les saponines, en particulier celles extraites du soja, peuvent être utilisées en cosmétique ou en pharmacie ou dermatopharmacie pour augmenter la quantité de collagène IV. Dans ce cas, elles permettent de renforcer la structure et les propriétés de la jonction dermo-épidermique, zone d'échange entre le derme et l'épiderme et zones très importantes pour les processus de différenciation des
20 kératinocytes.

Exemple 2

Mise en évidence de l'augmentation de la quantité de collagène IV en présence de saponines de Medicago

25 Cet essai est réalisé de la façon suivante :

Le produit à tester constitué par des saponines de racines de *Medicago sativa*, est disponible dans le commerce et commercialisé par la société Berkem, sous la forme d'une poudre.

Les tests ont été réalisés en aveugle, le produit étant dénommé saponine *Medicago*.

1. Protocole du test

a. Provenance des kératinocytes

Les cultures de kératinocytes humains normaux (KHN) sont établies à partir d'un prélèvement chirurgical de peau saine. Dans la présente étude, les tests ont été réalisés sur une souche cellulaire provenant d'un lifting d'une femme caucasienne de 48 ans, souche notée KHN 555.

b. Conditions de culture

Les kératinocytes sont cultivés de la même manière que celle décrite à l'exemple précédent, si ce n'est que les cellules ont été sous-cultivées 4 fois et récoltées au stade de la 4^e sous-culture ou 4^e passage, noté P4.

c. Conditions de traitement

L'ensemencement des cellules est réalisé en plaques de culture à 96 puits en raison de 30 000 KHN par puits dans le milieu K-SFM.

Après 24 h d'incubation nécessaire à la bonne adhérence des cellules, le milieu est remplacé par un milieu K-SFM dilué à 2 %, limitant la prolifération des kératinocytes.

Les produits selon l'invention sont préparés extemporanément dans le DMSO à une proportion respectivement de 2,5-10 et 25 mg/ml à partir du produit disponible dans le commerce, et ces solutions mères sont introduites dans le milieu d'étude à 0,1 % V/V final, soit des concentrations testées à 2,5-10 et 25 µg/ml. Le témoin reçoit l'excipient des produits, soit 0,1 % V/V de DMSO.

L'absence de cytotoxicité du produit selon l'invention aux différentes concentrations testées a été démontrée par ailleurs à l'aide des tests de viabilité XTT de chez BOEHRINGER, France.

Après 48 h de traitement, les surnageants en incubation sont prélevés en vue du dosage du collagène IV présent. Un dosage des protéines est effectué sur le tapis cellulaire restant dans les puits selon la méthode BCA de chez

SIGMA, dans le but de ramener la quantité de collagène IV présent au taux de protéines cellulaires.

d. Dosage ELISA du collagène IV

5 Le protocole de dosage est le même que celui de l'exemple 1, mais les modifications suivantes ont été apportées dans la mise au point du dosage.

- Premier anticorps : anticorps monoclonal de lapin anti-collagène IV humain de l'INSTITUT PASTEUR DE LYON, Réf. 20411.

10 - Gamme étalon réalisée avec du collagène de type IV humain d'origine placentaire humaine, SIGMA référencé C5533.

e. Expression des résultats et interprétation statistique

Les résultats des expériences exprimés selon la méthode décrite au e) de l'exemple 1, font l'objet du tableau II ci-après.

15

2. Résultats-conclusion

Les résultats sont donnés dans le tableau II ci-après à partir de la moyenne des mesures sur les différentes cultures :

20

TABLEAU II

PRODUITS	Q (ng de coll IV/ 100 µg prot. ; à 48 h)	A(%)	Significativité p = 0,05
TEMOIN K-SFM 2 % + DMSO 0,1 %	1,565+/-0,314	0	
saponines de luzerne (2,5 µg/ml)	1,745+/-0,409	+11	NS
saponines de luzerne (10 µg/ml)	2,858+/-0,529	+ 83	S
saponines de luzerne (25 µg/ml)	2,336+/-0,523	+ 49	S

S = significatif

NS : non significatif

25 On constate une augmentation significative de la quantité de collagène IV présent dans les cultures de kératinocytes humains normaux, réalisées en présence de saponines de racines de Medicago sativa ou luzerne. Les

concentrations actives de saponines sont de 10 et 25 $\mu\text{g/ml}$ avec le maximum d'activité à 10 $\mu\text{g/ml}$.

Ainsi, le produit selon l'invention est actif et peut être utilisé comme agent cosmétique pour fabriquer des compositions cosmétiques, pharmaceutiques ou dermatologiques permettant de renforcer la cohésion derme-épiderme comme pour l'exemple 1.

Exemple 3

Mise en évidence de l'augmentation de la quantité de collagène IV en présence de saponines extraites de graines de soja et de bêta-ecdysone.

Le protocole est le même que celui décrit dans l'exemple 1, ceci près différence que l'extrait de graines de soja (référence SOY SELECT LOT 26040/2 disponible auprès de la société italienne Indena) est utilisé associé avec de la bêta-ecdysone, dans un rapport pondéral 1/1 pour ces deux éléments, et que le temps de contact entre les produits à tester et les cellules est de 48 heures (au lieu de 72 heures).

Les résultats sont donnés dans le tableau III ci-après à partir de la moyenne des mesures sur les différentes cultures :

TABLEAU III

PRODUIT	Q (ng de coll IV/100 μg de protéines ; à 48 h)	A (%)	Significativité p = 0,05
témoin DMSO	1,565 \pm 0,314	0	
saponines de soja 2,5 $\mu\text{g/ml}$	1,643 \pm 0,320	+5	NS
saponines de soja 2,5 $\mu\text{g/ml}$ et bêta-ecdysone 2,5 $\mu\text{g/ml}$	2,441 \pm 0,360	+56	S
saponines de soja 5 $\mu\text{g/ml}$	1,682 \pm 0,317	+7,5	NS
saponines de soja 5 $\mu\text{g/ml}$ et bêta-ecdysone 5 $\mu\text{g/ml}$	2,081 \pm 0,340	+33	S
saponines de soja 10 $\mu\text{g/ml}$	1,972 \pm 0,331	+26	S
saponines de soja 10 $\mu\text{g/ml}$ et bêta-ecdysone 10 $\mu\text{g/ml}$	2,003 \pm 0,336	+28	S
saponines de soja 20 $\mu\text{g/ml}$	1,975 \pm 0,335	+26	S
saponines de soja 20 $\mu\text{g/ml}$ et bêta-ecdysone 20 $\mu\text{g/ml}$	1,998 \pm 0,342	+27,5	S

S= significatif

NS = non significatif

On constate à la lecture du tableau III, que l'utilisation de l'association, ou combinaison, des saponines de soja avec de la bêta-ecdysone, à certaines concentrations (2,5 et 5 µg/ml pour chacun des deux éléments) est encore plus efficace que l'utilisation des saponines de soja seules pour augmenter la quantité de collagène IV dans un milieu où sont présents des kératinocytes humains normaux.

La même expérience a été conduite en utilisant de la bêta-ecdysone seule. Aucune augmentation de la quantité de collagène IV n'a été constatée.

Les inventeurs ont donc conclu qu'il existe un effet de synergie entre les saponines de soja et la bêta-ecdysone pour ce qui est de la capacité de ces éléments à provoquer une augmentation de la quantité de collagène IV dans un milieu où sont présents des kératinocytes humains normaux.

La combinaison d'une saponine de soja avec la bêta-ecdysone semble donc être très efficace comme moyen pour augmenter la quantité de collagène IV dans un milieu où sont présents des kératinocytes humains normaux.

Ainsi, l'association de saponine et d'ecdystéroïde selon l'invention présente un grand intérêt pour des applications cosmétiques et pharmaceutiques, notamment dermatologiques.

20

Exemple 4

Crème luttant contre les marques du vieillissement

Rétinol	4000	UI
Saponines de soja de type B	0,01	g
Glycérine	3	g
Extrait de Commiphora mukkul	0,1	g
Excipient émulsion fluide	qsp. 100	g

A utiliser le soir pour traiter les rides, appliquer cette émulsion fluide en la faisant pénétrer.

25

Exemple 5

Crème anti-rides et préventive du photovieillissement

Rétinol	2000	UI
Palmitate de rétinol	0,01	g
Palmitate d'ascorbyl	0,1	g
Protéines de Blé	3	g

Saponines de soja	0,05	g
Madécassoside	0,05	g
Parsol MCX	7	g
Benzophénone 3	1	g
Beurre de Karité	1	g
Excipient crème parfumée	qsp. 100	g

Appliquer cette crème dès la fin d'après-midi, permet de réparer les rides de l'intérieur, et de protéger la peau des derniers rayons de soleil.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'au moins une saponine ou un sapogénol cosmétiquement acceptables, en particulier une saponine ou un sapogénol extrait
5 de plante, de préférence de soja ou d'une plante de type Medicago, ou d'un extrait végétal riche en de tels composés, comme agent cosmétique destiné à augmenter la quantité de collagène IV dans la jonction dermo-épidermique.

2. Utilisation d'au moins une saponine ou un sapogénol pharmaceutiquement acceptables, en particulier une saponine ou un sapogénol
10 extrait de plante, de préférence de soja ou d'une plante de type Medicago, ou d'un extrait végétal riche en de tels composés, pour la fabrication d'une composition pharmaceutique, notamment dermatologique destinée à traiter les pathologies liées à une déficience de la jonction dermo-épidermique résultant d'une quantité insuffisante de collagène IV.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2 d'au moins une saponine ou un sapogénol triterpénique, extrait de plante, en particulier d'une plante de type
15 Medicago tel que Medicago sativa.

4. Utilisation selon la revendication 1 ou 2 d'au moins une saponine ou un sapogénol extrait de soja.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce
20 que la saponine ou le sapogénol précité est extrait à partir de toute partie de la plante, de préférence à partir des racines dans le cas de Medicago et des graines dans le cas du soja.

6. Utilisation une la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la
25 saponine ou le sapogénol précité est une soyasaponine ou un soyasapogénol de type A ou de type B.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce
que la proportion en saponine(s) ou en sapogénol (s) ou en extrait végétal en contenant est comprise entre 0,001 % et 5 %, mieux entre 0,01 et 2 %, en poids,
30 par rapport au poids total de la composition cosmétique ou pharmaceutique finale.

8. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que la saponine ou le sapogénol est utilisé en association avec au moins un ecdystéroïde ou avec au moins un dérivés acétylé d'ecdystéroïde, en particulier avec la beta-ecdysone ou ecdystérone.

9. Utilisation selon l'une des revendications précédentes, caractérisée
35 en ce que la saponine ou le sapogénol est utilisé en association avec au moins une

autre substance active par exemple choisie parmi le groupe constitué par l'acide madécassique, l'acide asiatique, le madécassoside, l'asiaticoside, l' α -1-protéinase inhibiteur, les inhibiteurs de collagénase tels que l'acide rétinolique, les inhibiteurs d'élastase, la lysine, la proline, le 2-oxoglutarate, le ginsénoside R₀, la vitamine D
5 et ses dérivés, les vitamines, en particulier la vitamine A, B ou E ; les xanthines, la tyrosine ou ses dérivés comme par exemple le tyrosinate de glucose, la malyltyrosine, la quinine ou ses dérivés, les rubéfiants tels que le nicotinate de méthyle, des hydrolysats de kératine, des oligoéléments tels que le zinc, le sélénium, cuivre, des inhibiteurs de 5- α -réducteurs tels que progestérone, l'acétate
10 de cyprotérone, le minoxidil, l'acide azélaïque et ses dérivés, le 1,4-méthyl-4-azastéroïde, en particulier la 17- β -N,N-diéthylcarbamoyl-4-méthyl-4-aza-5- α -androstan-3-one, ou encore un extrait de *Serenoa repens*.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que la concentration en cette (ou ces) autre(s) substance(s) active(s) est comprise entre
15 0,0001 % et 5 % en poids par rapport au poids de la composition finale.

11. Composition cosmétique ou pharmaceutique favorisant l'augmentation de la quantité de collagène IV dans la jonction dermo-épidermique, caractérisée en ce qu'elle contient une quantité efficace de l'association d'au moins une saponine ou un sapogénol tels que définis à l'une
20 quelconque des revendications 1, 3 à 6, avec au moins un ecdystéroïde, en particulier l'ecdystérone.

12. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce que la saponine ou le sapogénol précité et l'ecdystéroïde précité sont associés dans un rapport pondéral compris entre 1 : 10 et 10 : 1, et de préférence égal à 1 : 1.

25 13. Procédé de traitement cosmétique, caractérisé en ce que l'on procède à l'administration topique à une personne en ayant besoin, d'une quantité efficace d'au moins une saponine ou d'au moins un sapogénol, tels que définis à l'une quelconque des revendications 1, 3 à 6, permettant d'augmenter la quantité de collagène IV dans la jonction dermo-épidermique, ladite saponine ou ledit
30 sapogénol étant éventuellement administré en association avec une ou plusieurs autre(s) substance(s) active(s) telle(s) que définie(s) à la revendication 9 ou en association avec un ecdystéroïde, en particulier l'ecdystérone.

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 558438
FR 9806821

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 96 25143 A (LVMH RECHERCHE) 22 août 1996 * revendications 1-4,7-11,14-18; exemples 1-11 *	1-3,5-7, 13
A	--- A.Y LEUNG: "Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics" 1996, WILEY-INTERSCIENCE PUBLICATION, NEW YORK (USA) XP002099892 * page 284, colonne 1, alinéa 3 * * page 28, colonne 2, alinéa 3 * * page 285, colonne 1, ligne 2 * -----	1-3,5-7, 13
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
19 avril 1999		Sierra Gonzalez, M
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		